



**AÇÃO DE BETACICLODEXTRINA NA
TOLERÂNCIA DE *SACCHAROMYCES
CEREVISAE* AO BENZALDEÍDO PARA
PRODUÇÃO DE L-FENIL-ACETIL-
CARBINOL**

MARCELLA CAPELLA PINHEIRO

Projeto Final de Curso

Orientadores:

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.

Mariana Miguez Tardelli Garcia, D. Sc

Março de 2021

AÇÃO DE BETACICLODEXTRINA NA TOLERÂNCIA DE SACCHAROMYCES CEREVISAE AO BENZALDEÍDO PARA PRODUÇÃO DE L-FENIL-ACETIL-CARBINOL

Marcella Capella Pinheiro

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovada por:

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr., D.Sc

Prof^a. Kelly Alencar Silva, D.Sc

Orientado por:

Prof^a. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.

Mariana Miguez Tardelli Garcia, D. Sc

Rio de Janeiro, R.J. – Brasil

Março de 2021

Ficha Catalográfica

Pinheiro, Marcella Capella.

Ação de betaciclodextrina na tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* ao benzaldeído para produção de L-fenil-acetil-carbinol/ Marcella Capella Pinheiro. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2021

x, 31 p.; il.

(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2021

Orientadores: Priscilla Filomena Fonseca Amaral e Mariana Miguez Tardelli Garcia

1. L-fenil-acetil-carbinol. 2. Betaciclodextrina. 3. Biotransformação. 4. Projeto Final. (Graduação - UFRJ/EQ). 5. Priscilla Filomena Fonseca Amaral e Mariana Miguez Tardelli Garcia. I. Título

Dedicatória

À minha mãe, minha fonte diária de energia. Minha maior incentivadora,
exemplo de resiliência e força.

Citação

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

“Quando você quer alguma coisa, todo o universo conspira para que você realize o seu desejo. ”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

À Deus que me permitiu chegar aqui e tem sido minha maior força e meu alicerce em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe, Flávia Vianna Capella, por ser meu exemplo e minha maior incentivadora. Por sempre acreditar em mim e ter sempre priorizado minha educação.

Ao meu grande companheiro Thiago por sempre querer o meu melhor, me incentivar a conquistar os meus objetivos e me apoiar em tudo. Por ser inspiração de dedicação e disciplina.

À Sheila e a Rafaela por cuidarem da minha mãe com tanto carinho e zelo.

As minhas orientadoras, professora Priscilla e Mariana, pelo tempo dedicado a mim, pela oportunidade de fazer parte do BIOSE, por incentivarem e me ajudarem ao longo dessa jornada. Agradeço imensamente o apoio e a compreensão.

À banca avaliadora, pela aceitação do convite de contribuir de forma crítica e construtiva para a conclusão deste trabalho.

À Escola de Química da UFRJ e ao seu corpo docente, pela formação acadêmica de excelência que fornecem a seus alunos.

A todos os professores do IFRJ que foram responsáveis por meus primeiros passos rumo à vida profissional.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

AÇÃO DE BETACICLODEXTRINA NA TOLERÂNCIA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE AO BENZALDEÍDO PARA PRODUÇÃO DE L-FENIL-ACETIL-CARBINOL

Marcella Capella Pinheiro

Março, 2021

Orientadores: Prof. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc

Mariana Miguez Tardelli Garcia, D. Sc.

A produção de L-fenilacetilcarbinol (L-PAC) por biotransformação de acetadeído e benzaldeído ocorre pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Benzaldeído, substrato necessário ao processo, é tóxico para as células e, visando diminuir esses efeitos, utilizou-se β -ciclodextrina no presente trabalho. As ciclodextrinas formam complexos do tipo receptor-substrato servindo como um ambiente único para reações químicas e possuem a habilidade de formar complexos de inclusão, resultando na liberação controlada do benzaldeído. Concentrações 10 g/L e 20 g/L de benzaldeído foram adicionadas após 1 h de cultivo com 2% de β -ciclodextrina em 50 mL de meio de produção e 30 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*, em Erlenmeyer de 250 mL. Obteve-se 6,27 g/L e 7,89 g/L de L-PAC com a adição de 10 g/L e 20 g/L de benzaldeído, respectivamente. Foi observado um aumento de mais de 7 vezes na produção e mais de 16 vezes na produtividade de L-PAC quando utilizada a concentração de 10 g/L quando comparado ao experimento sem a adição de β -ciclodextrina. A maior concentração de L-PAC, 7,89 g/L, foi obtida na concentração de benzaldeído de 20 g/L, porém o maior coeficiente de conversão foi obtido na presença de 10 g/L de benzaldeído. Portanto, a ação protetora de β -ciclodextrina da ação tóxica de benzaldeído foi comprovada e permitiu um aumento expressivo da produção de L-PAC.

ÍNDICE

Capítulo I – Introdução	1
Capítulo II - Revisão Bibliográfica	3
II.1 - L-Fenil-acetil-carbinol L-PAC	3
II.2 - Aplicações de L-PAC, pseudoefedrina e L-efedrina	3
II.3 - Biotransformação de L-PAC	5
II.4 - Ação tóxica de benzaldeído em leveduras	8
II.5 – Aplicabilidade de β -ciclodextrina	9
Capítulo III – Objetivos	13
Capítulo IV – Metodologia Experimental	14
IV.1 - Micro-organismo e manutenção da cultura	14
IV.2 - Estudo de crescimento celular e consumo de glicose	14
IV.2.1 – Cultivo em batelada simples	14
IV.2.2 - Cultivo em batelada alimentada	14
IV.3 – Produção de L-PAC	15
IV.3.1 - Pré-inóculo	16
IV.3.2 - Inóculo	16
IV.3.3 – Produção de L-PAC em <i>shaker</i>	16
IV.4 – Métodos analíticos	17
IV.4.1 - Quantificação do crescimento celular	17
IV.4.2 – Massa seca	17
IV.4.3 – Determinação da concentração de glicose	17
IV.4.4 – Quantificação de L-PAC, benzaldeído e sub-produtos	18
Capítulo V - Resultados	20
V.1 – Avaliação do crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i>	20
V.2 – Biotransformação de benzaldeído em L-PAC por <i>S. cerevisiae</i>	21
Capítulo VI – Conclusões	26
Referências Bibliográficas	27

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 - Estrutura do L-PAC (SHUKLA E KULKARNI, 2000).	3
Figura 2 - Obtenção do L-PAC através de biotransformação seguida de aminação redutiva para síntese de efedrina. (ROGER, SHIN e WANG, 1997).	4
Figura 3 - Conversão Química de L-Efedrina em D-Pseudoefedrina (adaptado de Khan, 2010).	4
Figura 4 - Reações bioquímicas comuns na produção de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000).	6
Figura 5 - Produção de L-PAC e álcool benzílico após 10 h pela cepa parental BY4741 e seis mutantes de deleção de um único gene (Adaptado de IRANMANESH, MOHAMMAD e BIRIA 2020).	7
Figura 6 - Oxidação da glicose 6-fosfato pela glicose 6-P desidrogenase (G6PD) formando 6-fosfoglicono-lactona e NADPH. Adaptado de IRANMANESH, MOHAMMA e BIRIA, 2020.	8
Figura 7 - Representação esquemática da α CD (a), β CD (b) e γ CD (c). Fonte: OLIVEIRA, R.; SANTOS, D. e COELHO, P., Ciclodextrinas: Formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480.6 70-83, 2009.	10
Figura 8 - Ilustração da metodologia experimental do cultivo em batelada simples e do cultivo em batelada alimentada.	15
Figura 9 - Cromatograma da amostra padrão de Benzaldeído a 283 nm por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna ODS Hipersil C18 (5 μ m, 250 \times 4.6 mm), fase móvel acetonitrila e tampão de fosfato numa proporção de 70:30 (v/ v) com vazão de 1 mL/min.	19
Figura 10 - Avaliação do crescimento celular e consumo de glicose de células de <i>S. cerevisiae</i> em 200 mL de meio de cultivo YPD em frascos de Erlenmeyers de 500 mL em incubador rotatório a 30°C e 200 rpm.	20
Figura 11 - Avaliação do crescimento celular em 200 mL de meio de cultivo YPD em frascos de Erlenmeyers de 500 mL em incubador rotatório a 30°C e 200 rpm, com alimentação de solução de glicose.	21
Figura 12 - Produção de L- PAC em frascos agitados com adição de 10 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina e o meio controle (sem adição de β -ciclodextrina).	22

Figura 13 - Produção de L- PAC em frascos agitados com adição de 20 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina e o meio controle (sem adição de β -ciclodextrina).....	23
Figura 14 - Efeito protetor da β -ciclodextrina frente a diferentes concentrações de benzaldeído. Resultados de 6 g/L, 7 g/L e 8 g/L reportados por MIGUEZ,2015.	24
Figura 15 - Formação de subprodutos em meio com adição de 10 g/L e 20 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina.....	25

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 - Resultados da concentração de benzaldeído sobre ação protetora da β -ciclodextrina, por <i>S.cerevisiae</i> imobilizadas em alginato de cálcio (Coughlin, Mahmoud e El-sayed, 1991).	11
Tabela 2 - Estudo da concentração de benzaldeído sobre ação protetora da β -ciclodextrina, por <i>S.cer.5</i> em meio de produção PB, concentração inicial de células de 30 g/L e de glicose de 80 g/L (MIGUEZ, 2015).	12
Tabela 3 - Resultados do estudo realizado com as concentrações de 10 g/L e 20 g/L de benzaldeído com e sem adição de 2% β -ciclodextrina em meio de produção contendo 40 g/L de glicose e concentração inicial de 30 g/L de <i>S. cerevisiae</i>	24

Capítulo I – Introdução

L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC), 1-hidroxi-1-fenilpropan-2-ona (IUPAC) também conhecido como 1-hidróxi-1-fenil-2-propanona ou cetona de Neuberg, é utilizado para síntese de L-efedrina, pseudoefedrina, noradrenalina, além de adrenalina, anfetamina, metanfetamina, fenilpropanolamina e fenilamina (ELLAIAH e KRISHNA, 1987; SHUKLA e KULKARNI, 2002). L-efedrina e pseudoefedrina são isômeros ópticos e são geralmente empregados na formulação de diversos medicamentos como descongestionantes e antiasmáticos (SHIN e ROGERS, 1995).

Toda efedrina produzida no país é proveniente do L-PAC importado pelas indústrias brasileiras, uma vez que o Brasil não possui nenhuma planta de síntese. O país se torna por este motivo totalmente dependente de suas importações de L-PAC para produzir a efedrina e pseudoefedrina necessárias para a elaboração de medicamentos. Além disso, o Brasil já importa uma boa quantidade dessas substâncias diretamente (MIGUEZ, 2015). O consumo de efedrina no Brasil é da ordem de 1 - 2 toneladas, enquanto o de pseudoefedrina é significativamente maior, exibindo valores anuais na faixa de 10 a 11 toneladas (ANVISA, 2014).

L-PAC pode ser sintetizado por síntese química ou por meio de biotransformação, porém a rota de biotransformação é preferida industrialmente (BRUSSE et al., 1988). A biotransformação de benzaldeído em L-PAC foi descrita pela primeira vez por Neuberg e Lieberman em 1921, utilizando levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae* como micro-organismo produtor.

A rota bioquímica é mediada pela ação de micro-organismos, em presença de benzaldeído, que é a rota mais empregada industrialmente. Suas vantagens em relação aos catalisadores químicos convencionais são a alta seletividade, a alta eficiência catalítica e condições operacionais moderadas.

Apesar de ser substrato para produção de L-PAC, o benzaldeído acaba sendo tóxico às células, quando em exposições prolongadas. Isso se dá principalmente, por alterações na permeabilidade da parede celular dos micro-organismos (LONG e WARD, 1989), mas também em parte pela inativação das enzimas da rota metabólica (CHOW et al., 1995). Nos últimos anos tem sido estudadas formas de proteção ao efeito tóxico do benzaldeído, como o uso de células imobilizadas em alginato de cálcio e uso de ciclodextrinas (MAHMOUD, EL-SAYED, e COUGHLIN, 1990).

A ciclodextrinas são amplamente utilizadas em vários setores como industrial alimentício e farmacêutico. Tal afirmação deriva primordialmente do fato das mesmas, por pertencerem à família dos oligossacarídeos macrocíclicos, formarem complexos do tipo receptor-substrato servindo como um ambiente único para reações químicas e possuírem a habilidade para formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias que têm suas propriedades alteradas pela complexação (CHUNG et al., 1990).

Foi evidenciado o efeito protetor de β -ciclodextrina em cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 834 imobilizada em alginato de cálcio utilizando as concentrações de benzaldeído de 12 g/L e 14 g/L em diferentes concentrações de β -ciclodextrina: 0,5%, 1,0% e 1,5% (MAHMOUD, EL-SAYED, e COUGHLIN, 1990). MIGUEZ (2015) reportou o aumento na concentração de L-PAC utilizando 8,0 g/L de benzaldeído na presença de 2% de β -ciclodextrina.

Portanto, pretende-se no presente trabalho estudar o efeito protetor de β -ciclodextrina devido a habilidade para complexação do benzaldeído resultando na liberação controlada do mesmo, utilizando concentrações elevadas de benzaldeído (10 e 20 g/L) na produção de L-PAC por *S. cerevisiae*.

Capítulo II - Revisão Bibliográfica

II.1 - L-Fenil-acetil-carbinol L-PAC

L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC), também conhecido como 1-hidróxi-1fenil-2-propanona ou cetona de Neuberg é uma substância altamente empregada como intermediário de fármacos. Sua estrutura é mostrada na Figura 1. Ele atua como um intermediário chave para a síntese de L-efedrina, pseudoefedrina, norefedrina, noropseudoefedrina, bem como adrenalina, anfetamina, metanfetamina, fenilpropanolamina e fenilamina (ELLAIAH e KRISHNA,1987).

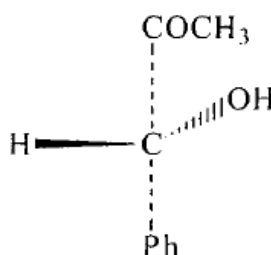


Figura 1 - Estrutura do L-PAC (SHUKLA E KULKARNI, 2000).

A biotransformação de benzaldeído em L-PAC foi descrita primeiramente em 1921 utilizando levedura de panificação como micro-organismo produtor (NEUBERG e LIBERMANN, 1921).

L-PAC pode ser sintetizado de duas formas: por síntese química ou através da biotransformação. Provavelmente a vantagem mais importante dos biocatalisadores em relação aos catalisadores químicos é que eles são mais quimio-, regio- e estereosseletivos. Nas reações catalisadas por agentes químicos pode ocorrer a formação de produtos secundários ou a formação de vários isômeros de um único produto. Neste caso o uso de biocatalisadores tem o potencial de produzir apenas o produto desejado com elevada seletividade. Tal seletividade elevada é de interesse óbvio para o setor farmacêutico, a partir do ponto de vista da síntese de intermediários quirais ou produtos finais (MIGUEZ, 2015).

II.2 - Aplicações de L-PAC, pseudoefedrina e L-efedrina

L-PAC possui grande parcela de sua gama de aplicações na elaboração de fármacos, agindo como material de partida para a síntese química de L-efedrina e pseudoefedrina, compostos químicos utilizados na formulação de

descongestionantes, antiasmáticos e, segundo a literatura em aplicações mais recentes, como medicamentos para controle de obesidade. (SHIN e ROGERS, 1995).

A síntese de L-efedrina a partir do L-PAC ocorre através de aminação redutiva empregando metilamina e é ilustrada na Figura 2.

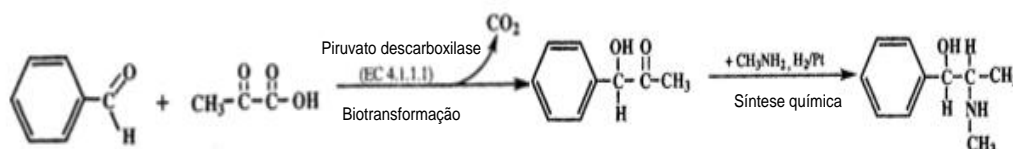


Figura 2 - Obtenção do L-PAC através de biotransformação seguida de aminação redutiva para síntese de efedrina. (ROGER, SHIN e WANG, 1997).

A pseudoefedrina é obtida quimicamente através do processo de inversão da efedrina, como pode ser visualizado na Figura 3.

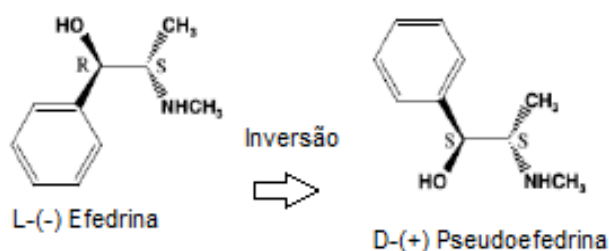


Figura 3 - Conversão Química de L-Efedrina em D-Pseudoefedrina (adaptado de Khan, 2010).

A efedrina, foi isolada em 1887, por Nagayoshi Nagai da *Ephedra sinica* Stapf. As espécies do gênero *Ephedra* pertencem à família *Ephedraceae* que contém cerca de 0,5% a 2,0% de alcalóides nos entrenós dos ramos. Dos quais 30 a 90% são a efedrina e o seu isômero, pseudoefedrina. (CABRAL e PITA, 2015). Plantas do gênero *Ephedra* (*Ephedraceae*), também conhecidas por “Ma Huang”, podem ser encontradas em zonas subtropicais da Ásia, Europa e Américas (WHO, 1999; Soni et al., 2004) e são usadas na medicina tradicional chinesa há mais de 5000 anos (CABRAL e PITA, 2015).

A obtenção de efedrina e pseudoefedrina em alta escala por processo extrativo é desvantajoso pois a concentração destes em fontes naturais não é significativa. (ABOURASHED et al., 2003).

A efedrina possui efeito broncodilatador e descongestionante e é usada para o alívio da asma, rinites, tosse e síndromas gripais e bronquites. O uso da pseudoefedrina para rinite é predominante. A efedrina é normalmente incluída em

suplementos de perda de peso, devido aos seus efeitos estimulantes. A efedrina tem uma ação idêntica à adrenalina, um hormônio estimulante produzido naturalmente pelo corpo. Este efeito estimulante provoca um aumento na taxa metabólica basal, que contribui para a perda de peso, mas também é fonte de efeitos colaterais potencialmente graves. (CABRAL e PITA, 2015).

A efedrina é um simpaticomimético misto de ação nos receptores α e β adrenérgicos e atua a partir da liberação de noradrenalina dos neurônios simpáticos. Isso permite uma elevação da frequência e o débito cardíaco e aumento da pressão arterial, pois agem, principalmente, sobre os receptores α -adrenérgicos, inclusive com aumento na contração de musculatura lisa. Além disso, quando atua nos receptores β adrenérgicos promove broncodilatação. Os efeitos do fármaco podem persistir por várias horas quando administrada por via oral e tem sua meia-vida por volta de 3 a 6 horas. (SILVA, MENEZES, DE SÁ, 2020).

O estimulante do sistema nervoso central e talvez os efeitos termogênicos têm o propósito de proporcionar maior perda de peso na obesidade e melhor desempenho no treinamento de resistência ou musculação. Embora a efedrina suprima o apetite, o principal mecanismo para promover a perda de peso parece ser o aumento do metabolismo taxa de tecido adiposo (MURRAY, 1995). Tendo em vista as atividades farmacológicas estabelecidas, a administração de efedrina é contra-indicada em pacientes com hipertensão ou outras doenças cardiovasculares, glaucoma, diabetes e hipertireoidismo (FETROW e AVILA, 2001).

II.3 - Biotransformação de L-PAC

A produção de L-PAC por biotransformação tem como via metabólica principal a glicólise, através do qual é gerado o piruvato (e consequentemente o “acetaldeído ativo”) que reage com o benzaldeído, na presença da enzima piruvato descarboxilase (PDC), que possui um papel muito importante na biotransformação (Figura 4). É uma enzima encontrada nos organismos que realizam fermentação alcoólica, sendo responsável pela transformação do piruvato produzido na glicólise em acetaldeído, que juntamente com NADH e um íon H^+ produzirá etanol e NAD^+ (OLIVER, RODDICK, e ANDRESON, 1997).

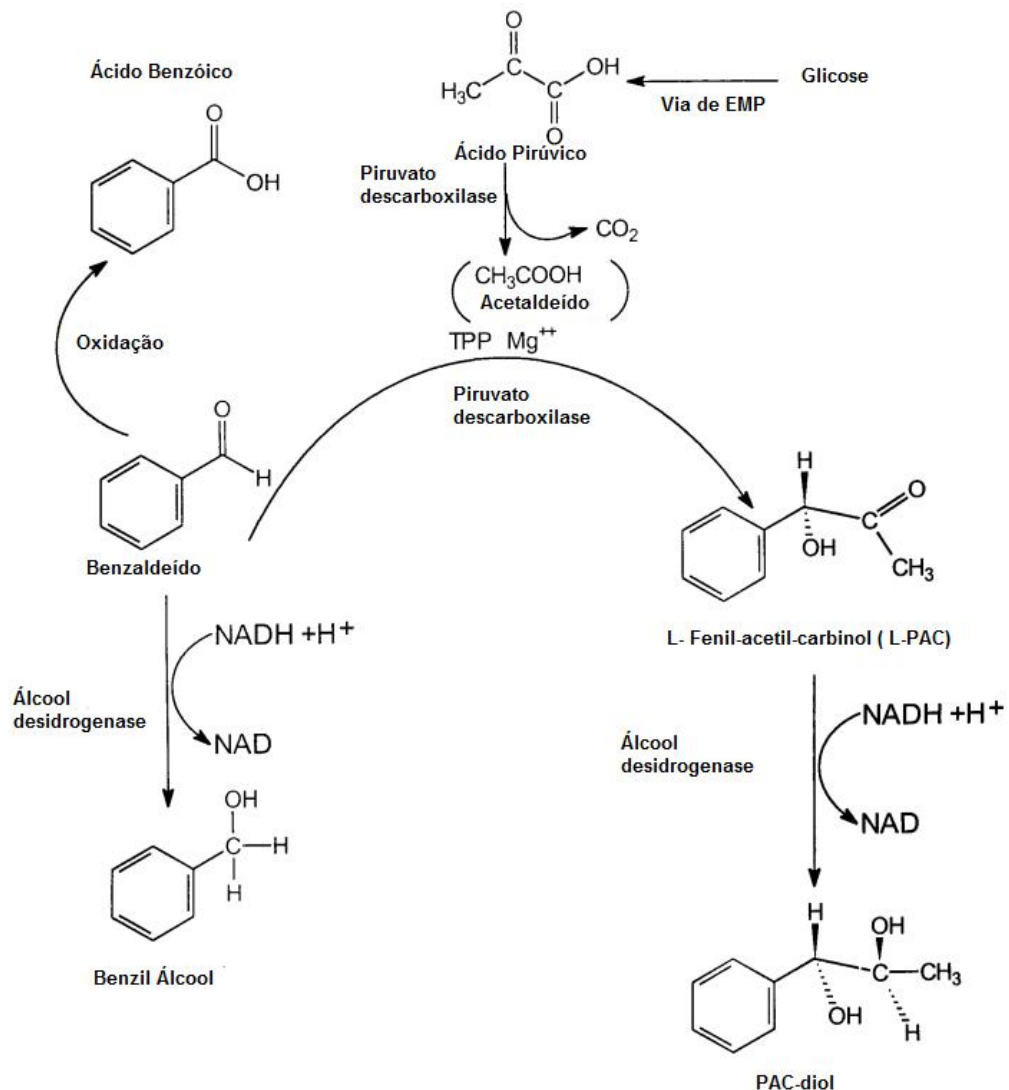


Figura 4 - Reações bioquímicas comuns na produção de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000).

Algumas reações indesejadas como a redução do benzaldeído a álcool benzílico e do L-PAC a PAC-diol, ambas catalisadas pela enzima álcool desidrogenases (ADH), e a oxidação do benzaldeído a ácido benzoico podem acontecer, devido ao metabolismo do micro-organismo (LONG e WARD, 1989). As reações de redução dos aldeídos são necessárias para restabelecer o equilíbrio redox da glicólise. Uma das estratégias para melhorar a produção de L-PAC é a adição de aceptores de elétrons ao meio, como acetona e acetaldeído, para que estes sejam reduzidos e acabem disponibilizando mais benzaldeído para a síntese de L-PAC, bem como diminuindo a redução do próprio L-PAC a PAC-diol. A adição de extratos celulares também possibilita um aumento da produção de L-PAC, devido ao aumento dos níveis de piruvato, TPP e Mg²⁺ (VOJTISEK e NETRVAL, 1982).

A conversão quantitativa de benzaldeído em L-PAC nunca foi alcançada (SHUKLA e KULKARNI, 2000). Este fato pode ser ocasionado principalmente pela competição de álcool benzílico e ácido benzóico com L-PAC no uso de benzaldeído como substrato, e também pela redução de L-PAC a PAC-diol. Embora a via metabólica seja intrínseca ao micro-organismo, o sistema sofre de inibição de substrato, produto e subprodutos.

Para superar os efeitos inibitórios e aumentar o rendimento várias estratégias como a triagem de micro-organismos robustos (ROSCHE et al., 2003), empregando células imobilizadas (DOOSTMOHAMMADI et al., 2015), utilização de enzimas purificadas (GUNAWAN et al., 2008; SEHL et al., 2017) e aplicação de sistemas bifásicos (KHAN e DAUGULIS, 2010) foram examinados. Estratégias para diminuir a formação de subproduto ou aumentar a atividade de descarboxilação oxidativa tiveram sucesso limitado (AGARWAL et al., 2015; BRUDER e BOLES, 2017; NIKOLOVA e WARD, 1991).

Estudo com manipulação genética para identificar novos genes-alvo para o aumento da produção de L-PAC em leveduras também foi realizado e 2,40 g/L de L-PAC foram obtidos, o que é equivalente a 88% do rendimento teórico usando 2 g/L de benzaldeído, como pode ser observado na Figura 5 (IRANMANESH, MOHAMMAD, BIRIA, 2020).

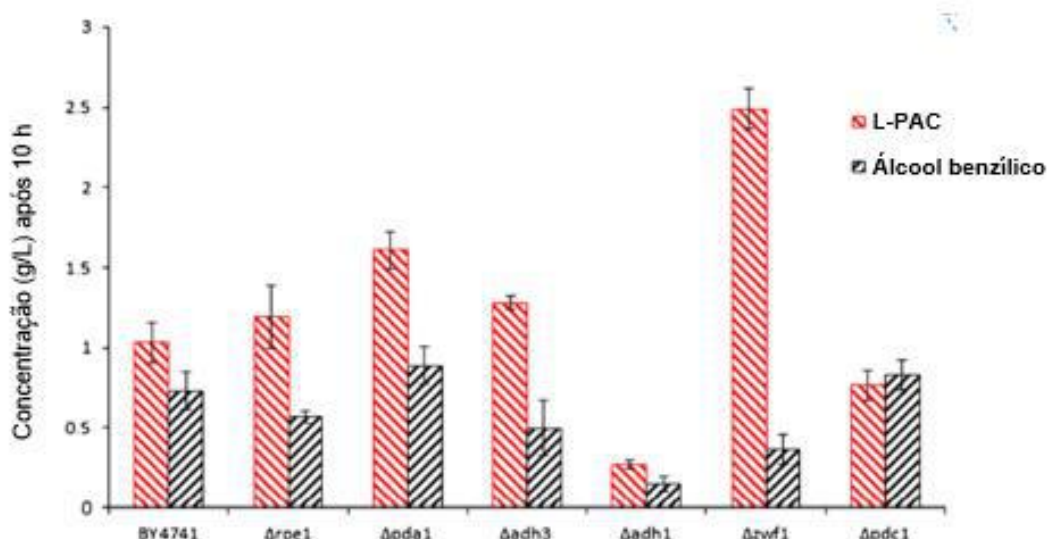


Figura 5 - Produção de L-PAC e álcool benzílico após 10 h pela cepa parental BY4741 e seis mutantes de deleção de um único gene (Adaptado de IRANMANESH, MOHAMMAD e BIRIA 2020).

O principal papel da parte oxidativa da via das pentoses-fosfato é a geração de NADPH. IRANMANESH, MOHAMMAD e BIRIA (2020) evidenciaram que a exclusão do gene $\Delta zwf1$ das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica a glicose desidrogenase como a enzima ativa para a primeira reação da via (Figura 6), reduz os níveis de NADPH. Os resultados também demonstraram que a baixa concentração de álcool benzílico formado na cepa mutante é devido a baixa concentração de NADPH formado. BRUDER e BOLES (2017) também evidenciaram que ao reduzir a síntese de NADPH, a formação de álcool benzílico foi significativamente diminuída.

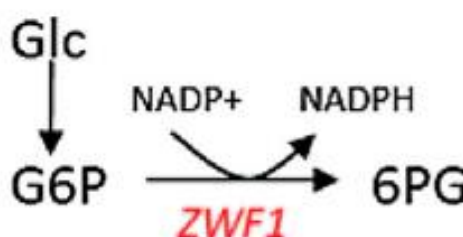


Figura 6 - Oxidação da glicose 6-fosfato pela glicose 6-P desidrogenase (G6PD) formando 6-fosfoglicono-lactona e NADPH. Adaptado de IRANMANESH, MOHAMMA e BIRIA, 2020.

II.4 - Ação tóxica de benzaldeído em leveduras

Benzaldeído, apesar de ser substrato para produção de L-PAC, acaba sendo tóxico às células, quando em exposições prolongadas. Isso se dá, principalmente, por alterações na permeabilidade da parede celular dos micro-organismos (LONG e WARD, 1989), mas também em parte pela inativação das enzimas da rota metabólica, como a PDC principal enzima na biotransformação (CHOW et al., 1995).

A adição controlada de benzaldeído ao longo do processo, principalmente por pulsos (LONG e WARD, 1989), ajuda a controlar a toxicidade do meio para alcançar concentrações maiores de L-PAC.

SHIN e ROGERS (1995) estudaram a produção de L-PAC adicionando benzaldeído de forma a manter sua concentração próxima a 2 g/L utilizando *Candida utilis* imobilizada. Ao controlar o nível de benzaldeído em 2 g/L, mantendo um quociente respiratório de 5–7 e alimentação de glicose pulsada, uma concentração final de 15,2 g/L de L-PAC foi alcançada em um processo descontínuo alimentado. Em um processo contínuo de estágio único com *C. utilis* imobilizada, a concentração

de L-PAC no estado estacionário foi significativamente reduzida por causa dos efeitos tóxicos sustentados do benzaldeído.

Khan et al. (2012) otimizaram o número de adições de benzaldeído e a máxima concentração de L-PAC (3,62 g/L) foi obtida com a adição de 6 doses de benzaldeído em volume desigual, em ordem decrescente de concentração de benzaldeído totalizando 6,3 g/L. LONG e WARD (1989), SHUKLA e KULKARNI (2001) e KUMAR, CHARI e NARASU (2010) também relatam a utilização de benzaldeído na concentração de 6,0 g/L para a produção de L-PAC utilizando células livres de diferentes espécies: *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *C. pseudointermedia*, respectivamente. Mas os resultados não foram concordantes com os de MAHMOUD, EL-SAYED e COUGHLIN (1990) que observaram que as células livres poderiam tolerar uma concentração benzaldeído de apenas 4,0 g/L. A diminuição ou aumento desta concentração de benzaldeído gera uma menor produção de L-PAC, devido à formação de produtos secundários e toxicidade.

MIGUEZ (2015) evidenciou que o tempo de adição de benzaldeído é um parâmetro de extrema importância para a produção de L-PAC. A adição de benzaldeído logo no início do cultivo influencia o crescimento celular, provavelmente pela inibição de uma ou mais enzimas do metabolismo. Observou-se que não há aumento do crescimento celular, indicando uma tendência de não haver duplicação celular. As células se adaptam ao meio, iniciando o aumento da concentração de células, o que indicou que o fluxo de carbono ocorre, favorecendo as enzimas do metabolismo celular. Com a adição do benzaldeído em 1,5 ou 3 h, a enzima PDC passou a converter o piruvato, que estava sendo gerado pelo fluxo de carbono, em L-PAC.

Adição posterior de benzaldeído (4,5 h) não se mostrou favorável à produção de L-PAC pois as células já se encontravam-se em fase estacionária de crescimento, momento em que a maior parte da glicose já havia sido consumida para o crescimento celular. Assim, não há mais piruvato disponível para a bioconversão (MIGUEZ, 2015).

II.5 – Aplicabilidade de β -ciclodextrina

As ciclodextrinas (CDs) pertencem à família dos oligossacarídeos macrocíclicos, formam complexos do tipo receptor-substrato servindo como um ambiente único para reações químicas e possuem a habilidade de formar complexos

de inclusão com uma variedade de substâncias que têm suas propriedades alteradas pela complexação (CHUNG et al., 1990). Por este motivo, as CDs vêm sendo muito utilizadas em produtos industriais, tecnológicos e em métodos analíticos. Como os efeitos tóxicos podem ser eliminados ou reduzidos pela seleção da CD apropriada, as CDs podem ser utilizadas como ingredientes de fármacos, em alimentos ou em cosméticos (SZEJTLI, 1998).

As ciclodextrinas (Figura 7) são polímeros de estrutura cíclica de unidade de D-glucopiranosose estabelecendo ligações do tipo α -(1-4).

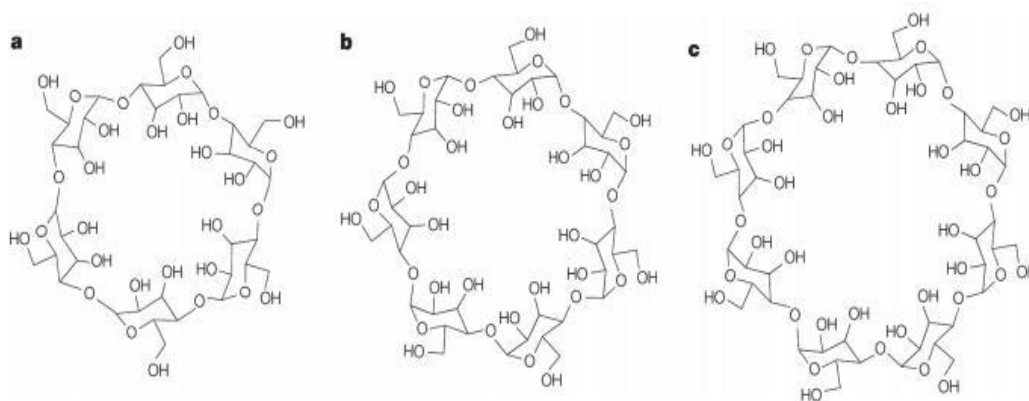


Figura 7 - Representação esquemática da α CD (a), β CD (b) e γ CD (c). Fonte: OLIVEIRA, R.; SANTOS, D. e COELHO, P., Ciclodextrinas: Formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480.6 70-83, 2009.

Os grupos hidroxila posicionados externamente conferem características hidrófilas às CDs tornando-se solúveis na água e insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. O interior da cavidade é constituído pois dois anéis de grupos C-H e por um anel de átomos de oxigênio glicosídicos conferindo ao seu interior características hidrófobas (OLIVEIRA, SANTOS e COELHO, 2009).

As ciclodextrinas naturais são largamente usadas como agentes complexantes, uma vez que apresentam numerosas vantagens (UEKAMA, HIRAYAMA e IRIE, 1998), são elas: possuem uma estrutura química bem definida com possibilidade de serem modificadas quimicamente, possuem diferentes tamanhos de cavidade permitindo a inclusão de moléculas com diferentes dimensões e apresentam reduzida atividade farmacológica e toxicológica.

β -ciclodextrina (BCD) é a mais utilizada das CDs pois apresenta uma capacidade de complexação de um elevado número de fármacos hidrofóbicos, está disponível em elevadas quantidade e a baixo custo e seu uso está aprovado como

excipiente farmacêutico, apesar da sua baixa solubilidade aquosa (VEIGA, PECORELLI e RIBEIRO, 2006).

MAHMOUD, EL-SAYED e COUGHLIN (1990) evidenciaram a ação protetora de β -ciclodextrina com 0,5, 1,0 e 1,5% de BCD no meio de fermentação e doses cumulativas de benzaldeído de 12 g/L e 14 g/L, rendimentos significativamente maiores de L-PAC foram obtidos, cerca de um a duas vezes o dos rendimentos dos experimentos de controle.

A adição de β -ciclodextrina resultou na retenção e liberação controlada de benzaldeído e proteção das células de *S. cerevisiae*, imobilizadas em alginato de cálcio, dos efeitos tóxicos do benzaldeído, aumentando assim a formação de L-PAC (COUGHLIN, MAHMOUD e EL-SAYED, 1991). De acordo com a Tabela 1 diferentes concentrações de β -ciclodextrina foram testadas, frente a 35 g/L de concentração celular e diferentes concentrações de benzaldeído. Pode-se observar na Tabela 1 uma maior taxa de conversão de L-PAC em concentrações menores de benzaldeído e β -ciclodextrina, chegando a um rendimento de 33% em comparação ao meio sem adição com β -ciclodextrina.

Tabela 1 - Resultados da concentração de benzaldeído sobre ação protetora da β -ciclodextrina, por *S.cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio (Coughlin, Mahmoud e El-sayed, 1991).

Condições			Resultados
β -ciclodextrina (%)	Conc. Celular (g/L)	Conc. Benzaldeído (g/L)	Conc. Máx. de L-PAC (g/L)
0,0	35	12,0	9,0
0,0	35	14,0	5,0
0,5	35	12,0	11,0
1,0	35	12,0	12,0
1,0	35	14,0	8,0
1,5	35	14,0	12,0

MIGUEZ (2015) reportou o aumento na concentração de PAC utilizando 8,0 g/L de benzaldeído na presença de 2% de β -ciclodextrina, em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL do meio, concentração inicial de *Saccharomyces cerevisiae* de 30 g/L e adição de benzaldeído após 1,5 h de fermentação. Nas concentrações inferiores a 8,0 g/L de benzaldeído o efeito de β -ciclodextrina foi prejudicial para produção de L-PAC uma vez que nestas concentrações a ação tóxica ainda não foi verificada e nem

todo o benzaldeído foi liberado ficando complexada por β -ciclodextrina (MIGUEZ, 2015).

Utilizando 80 g/L de glicose e concentração inicial de 30 g/L de células, a máxima concentração de L-PAC atingida foi de 5,13 g/L, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudo da concentração de benzaldeído sobre ação protetora da β -ciclodextrina, por S.cer.5 em meio de produção PB, concentração inicial de células de 30 g/L e de glicose de 80 g/L (MIGUEZ, 2015).

Condições				Resultados		
Benzaldeído (g/L)	β -ciclodextrina (%)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	Peptona (g/L)	PACmax (g/L)	Tempo PAC _{max} (h)	(Pr) PAC (g/Lh)
6,0	0,0	1,0	5,0	4,56	4,5	1,01
6,0	2,0	1,0	5,0	3,19	4,5	0,71
7,0	0,0	1,0	5,0	4,00	7,0	0,57
7,0	2,0	1,0	5,0	3,59	4,5	0,80
8,0	0,0	1,0	5,0	1,57	7,0	0,22
8,0	2,0	1,0	5,0	5,13	7,0	0,73

Capítulo III – Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de β -ciclodextrina na produção de L-PAC por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de benzaldeído.

Objetivos específicos:

- Estudar a cinética de crescimento celular e consumo de glicose de *S. cerevisiae* IMUFRJ51600 em batelada simples e batelada alimentada, visando uma maior concentração celular;
- Produzir L-PAC a partir de benzaldeído utilizando *S. cerevisiae*;
- Verificar o efeito tóxico de benzaldeído para as células de *S. cerevisiae*;
- Avaliar o efeito da adição de β -ciclodextrina (2%) para redução do efeito tóxico de benzaldeído para as células de *S. cerevisiae*.

Capítulo IV – Metodologia Experimental

IV.1 - Micro-organismo e manutenção da cultura

O micro-organismo utilizado no trabalho foi a cepa *Saccharomyces cerevisiae* IMUFRJ 51600 cedida pelo Instituto de Microbiologia da UFRJ. As células foram conservadas por repiques regulares em tubos de ensaio com meio YPD, contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 3% sob refrigeração 4°C. Os repiques eram realizados em capela de fluxo laminar equipada com luz UV.

IV.2 - Estudo de crescimento celular e consumo de glicose

Este estudo foi realizado em batelada simples e batelada alimentada, visando estudar a cinética de crescimento celular e aumento da concentração de células para servir de inóculo para a produção de L-PAC.

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD estocados em geladeira (4°C) inoculou-se, de forma estéril, 200 mL de meio de cultivo YPD em frascos de *Erlenmeyers* de 500 mL. O experimento foi realizado em incubador rotatório a 30°C e 200 rpm.

IV.2.1 – Cultivo em batelada simples

Foi realizado o acompanhamento do crescimento celular e consumo de glicose da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, nas 12 horas seguintes de seu inóculo a partir da cultura estocada em geladeira (4°C), considerado o pré-inóculo tradicional. Foram retiradas duas amostras, de 1,5 em 1,5 hora: uma era convenientemente diluída para leitura da absorbância em espectrofotômetro para obtenção da concentração celular. A outra alíquota (5 mL) era centrifugada a 18 g durante 7 minutos, sendo o sobrenadante armazenado para análise da concentração de glicose. Ambas as amostras eram retiradas com o auxílio de pipetas estéreis e de forma asséptica em cabine de fluxo laminar. O esquema experimental encontra-se ilustrado na Figura 8.

IV.2.2 - Cultivo em batelada alimentada

Foi realizado o acompanhamento do crescimento celular e consumo de glicose da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, no período de 24 horas. Primeiramente as células estocadas em geladeira (4 °C) foram inoculadas em meio YPD e assim

mantidas a 200 rpm e 30°C por 12 horas. Uma alíquota de 50 mL do *Erlenmeyer* contendo as células era transferida para um novo meio contendo 200 mL de YPD. Assim, o novo pré-inóculo já teria células da fase exponencial de crescimento celular, aptas a crescer em meio YPD. A partir dessa inoculação, iniciou-se o processo de monitoramento do cultivo pela retirada de amostras. O esquema experimental encontra-se ilustrado na Figura 8.

Foram retiradas duas amostras, de 1,5 em 1,5 horas: uma era convenientemente diluída para leitura da absorbância em espectrofotômetro para obtenção da concentração celular, e a outra alíquota (5 mL) era centrifugada a 18 g durante 7 minutos, sendo o sobrenadante armazenado para análise da concentração de glicose, sendo ambas retiradas com o auxílio de pipetas estéreis e de forma asséptica em câmara de fluxo laminar.

No momento em que foi verificada o esgotamento da glicose (concentração de glicose próxima a zero) foram adicionados 10 mL da solução de glicose 40%. Nos momentos seguintes, sempre que se detectava esgotamento da glicose, eram adicionados 20 mL da solução de glicose 40% no *Erlenmeyer* contendo o crescimento.

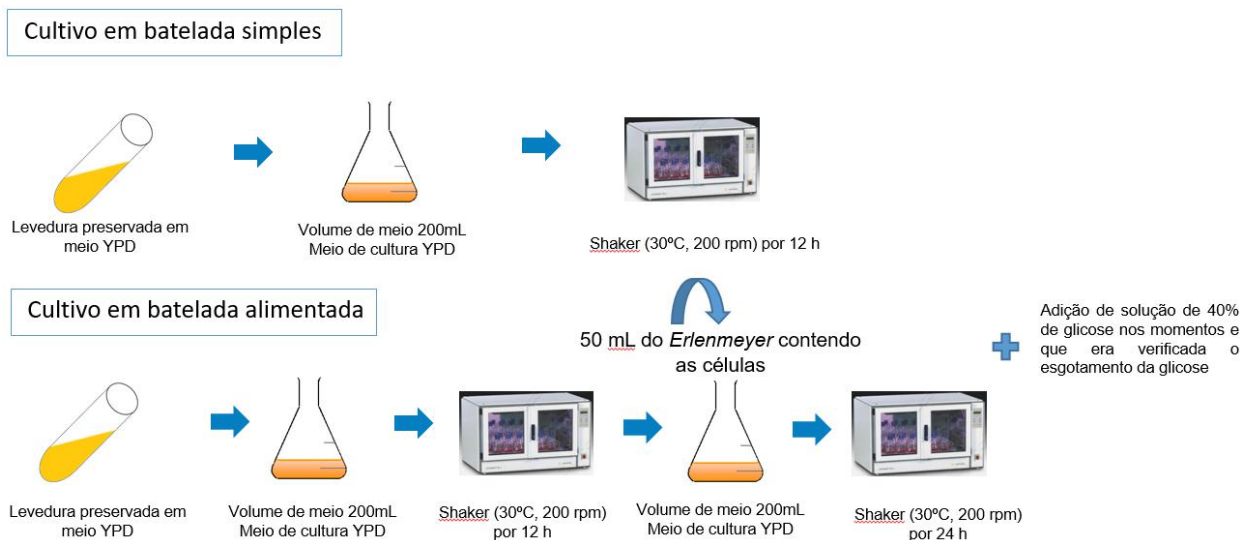


Figura 8 - Ilustração da metodologia experimental do cultivo em batelada simples e do cultivo em batelada alimentada.

IV.3 – Produção de L-PAC

IV.3.1 - Pré-inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD inoculou-se, de forma estéril, com o auxílio de uma alça de platina, toda a massa celular em 200 mL de meio de cultivo YPD em frascos de *Erlenmeyers* de 500 mL. O experimento foi realizado em incubador rotatório a 30°C e 200 rpm, com alimentação de solução de glicose 40% com o volume necessário para obter uma concentração final de 2% de glicose após de 8 h de incubação, mantendo-o por 24 h.

IV.3.2 - Inóculo

Após o tempo de incubação do pré-inóculo, retirou-se uma alíquota para determinação da concentração celular, através da leitura da absorvância (570 nm). Após a determinação da concentração celular calculou-se o volume a ser centrifugado de massa celular, visando uma concentração de 30 g/L para iniciar o experimento. O volume calculado foi transferido para tubos estéreis de 50mL e as células foram centrifugadas a 3.000 *g* por 7 minutos e ressuspensas em meio de produção de L-PAC.

IV.3.3 – Produção de L-PAC em *shaker*

Utilizou-se *Erlenmeyers* de 250 mL com 50 mL de meio de produção otimizado por MIGUEZ et al. (2012) contendo suspensão celular na concentração inicial desejada.

O meio de produção era composto de: Glicose 40 g/L; Peptona 5 g/L; Extrato de lêvedo 10 g/L; MgSO₄.7H₂O 5 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,05 g/L; Na₂HPO₄ 35 g/L, Ácido cítrico 2 g/L; β-ciclodextrina 20 g/L e Benzaldeído 10 g/L ou 20 g/L (MIGUEZ et al. 2012).

Foram realizados experimentos com adição de 10 g/L e 20 g/L de benzaldeído. Para cada concentração de benzaldeído avaliada foi feito a produção controle, ou seja, meio de produção sem a adição de β-ciclodextrina para avaliação da capacidade protetora ao efeito tóxico do benzaldeído.

O benzaldeído nas respectivas concentrações desejadas foi adicionado após a primeira hora de incubação.

Amostras de 5 mL foram coletadas nos respectivos tempos: 0 h, 1,5 h, 3 h, 4,5 h e 7 h para acompanhamento do crescimento de biomassa, produção de L-PAC,

concentração de glicose, concentração de benzaldeído e formação de sub-produtos. As alíquotas foram submetidas a centrifugação a 18 g por 7 minutos para separar a biomassa e segregar a alíquota para posterior quantificação.

IV.4 – Métodos analíticos

IV.4.1 - Quantificação do crescimento celular

As suspensões celulares foram quantificadas através de leituras das absorvâncias em espectrofotômetro, a 570 nm, e transformadas em massa de células secas através de um fator de conversão obtido previamente pelo método de Massa Seca (Vitolo, 1995).

IV.4.2 – Massa seca

A partir de uma suspensão de células em meio de cultivo YPD são retiradas alíquotas, que são centrifugadas (18 g) e ressuspensas em solução salina 0,9%. Este procedimento é repetido por duas vezes, até que não haja mais resquícios de componentes do meio de cultivo na nova suspensão formada. Desta suspensão, retira-se uma amostra (10 mL, aprox.), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 µm), seca em luz infra-vermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. O processo de secagem e pesagem é repetido até peso constante. Da mesma suspensão são feitas diluições diferentes para se obter diferentes concentrações celulares e então mede-se a absorvância em espectrofotômetro (*Bel Photonic*) a 570 nm. Através de uma regressão linear dos valores de concentração celular (massa seca) versus absorvância obtém-se um fator de conversão. (OLIVEIRA et al., 2010).

IV.4.3 – Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase (RAABO e TERKILDTSEN, 1960). A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose produzindo ácido glucônico e H₂O₂. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando a substância antipirilquinonimina de coloração vermelha.

Neste método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, em temperatura de 20-25°C contra reagente branco (reagente enzimático).

Tomam-se alíquotas de 10 µL de amostra/padrão e completa-se com 1000 µL de Reagente Enzimático. Homogeneiza-se e incuba-se 20 min a 20-25 °C. Deve-se medir a absorvância da amostra e do padrão contra o reagente branco em no máximo 60 minutos.

Para os pontos de 1,5 h e 3 h foi necessário a diluição da amostra para determinação da concentração de glicose, devido a elevada concentração nas primeiras horas do experimento. Para os tempos de 1,5 h e 3 h a amostra foi diluída 20x e 10x, respectivamente. Para os demais pontos a diluição não é necessária, devido a diminuição da concentração de glicose ao longo do experimento.

O padrão de glicose pertencente ao kit enzimático possui uma concentração de 100 mg/dL ou 5,55 mmol/L e o reagente enzimático contém tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol/L; 4-aminofenazona 0,25 mmol.L⁻¹; fenol 0,75 mmol.L⁻¹; glicose oxidase 15000 U.L⁻¹; peroxidase 1500 U.L⁻¹; mutarotase 2000 U.L⁻¹.

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da equação:

$$C = \frac{A_a}{A_p}$$

onde:

Aa = Absorvância da amostra;

Ap = Absorvância do padrão;

C = concentração de glicose na amostra (mg.dL⁻¹).

IV.4.4 – Quantificação de L-PAC, benzaldeído e sub-produtos

O substrato (benzaldeído), o produto (L-PAC) e os sub-produtos (ácido benzóico e álcool benzílico) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna ODS Hipersil C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm) conforme descrito por ROSCHE et al. (2001). A fase móvel consistia numa mistura de acetonitrila e tampão de fosfato numa proporção de 70:30 (v/ v) segundo metodologia descrita por ZHANG et al. (2008) e desgaseificada durante 20 minutos em ultrassom. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min com detecção UV a 283 nm (o álcool benzílico foi determinado a 254 nm). Sob estas condições, os tempos de retenção do ácido benzóico, álcool

benzílico, L-PAC e benzaldeído, são respectivamente, 7,5 min, 6 min, 6,8 min e 11,5 min. Foram injetados 50 µL de cada amostra, com 15 minutos de corrida. Cada amostra foi diluída 10x em água. Em seguida, a concentração de substrato e a concentração de subprodutos foram determinados através de comparação com o padrão. Amostras padrão com as concentrações de 5 g/L de ácido benzóico, álcool benzílico e benzaldeído eram injetadas antes de toda quantificação a ser realizada. Amostra padrão com 1,84 g/L de L-PAC foi utilizada. Na Figura 9 pode ser observado o cromatograma da amostra de benzaldeído, com tempo de retenção de 11,326 min.

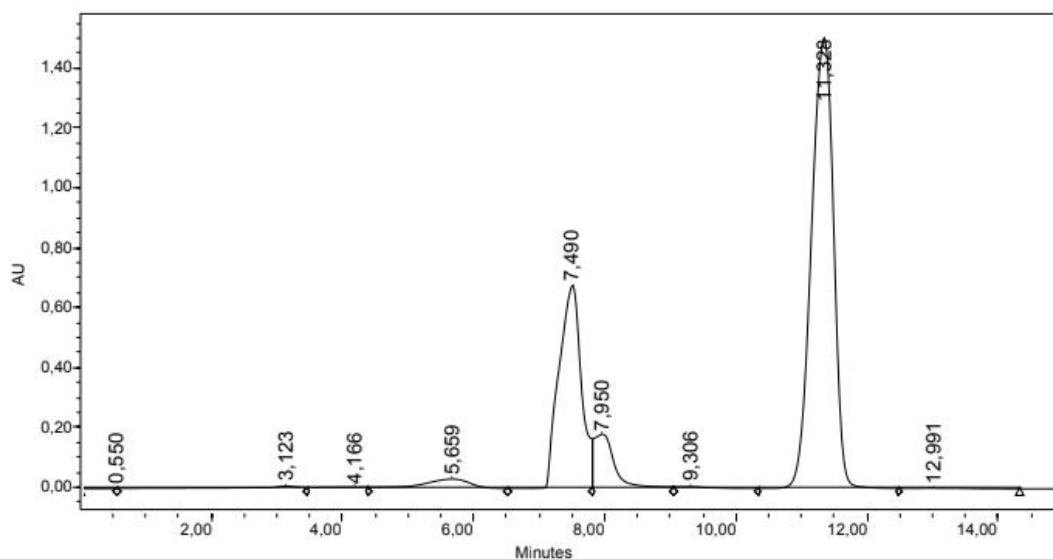


Figura 9 - Cromatograma da amostra padrão de Benzaldeído a 283 nm por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna ODS Hipersil C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm), fase móvel acetonitrila e tampão de fosfato numa proporção de 70:30 (v/ v) com vazão de 1 mL/min.

Capítulo V - Resultados

V.1 – Avaliação do crescimento celular de *S. cerevisiae*

A produção de L-PAC depende do metabolismo celular e da concentração de células. Desta forma foram estudados o crescimento celular e o consumo de glicose de células em batelada simples (pré-inóculo) e batelada alimentada por pulsos, visando uma maior concentração de *S. cerevisiae*, aumentando assim a concentração inicial do biocatalisador para bioconversão de benzaldeído em L-PAC.

A Figura 10 apresenta a concentração celular e a concentração de glicose medida ao longo do cultivo em meio YPD em *Erlenmeyer* de 500 mL com 200 mL de meio de cultivo, com células inoculadas a partir da cultura de estoque mantida em geladeira (4°C).

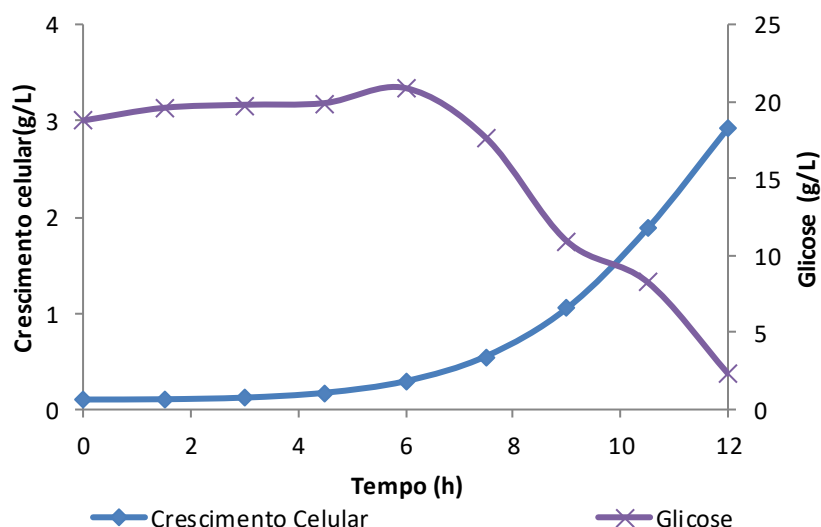


Figura 10 - Avaliação do crescimento celular e consumo de glicose de células de *S. cerevisiae* em 200 mL de meio de cultivo YPD em frascos de *Erlenmeyers* de 500 mL em incubador rotatório a 30°C e 200 rpm.

De acordo com a cinética do crescimento representada na Figura 10, pode-se observar que o crescimento celular foi baixo no período de 7 horas, pois as células ainda se encontravam na fase lag, adaptando-se ao novo meio. Conseguiu-se assim ao final do experimento uma concentração de 2,93 g/L de células. Pode-se observar que a glicose contida no meio de cultivo foi quase toda consumida, restando menos de 3 g/L. Assim, assume-se que as células nesse momento se encontram em fase exponencial (que também pode ser observado pela curva de crescimento celular), que é o momento ideal para inocular um novo meio. Portanto, foi escolhido esse tempo

para recolher as células desse cultivo e inocular um novo meio YPD em um processo de batelada alimentada para elevar a concentração de células e assim poder iniciar o cultivo de biotransformação de L-PAC com um inóculo maciço (30 g/L).

Pode-se observar na Figura 11, que utilizando as células do pré-inóculo (cultivo em batelada simples) para início do cultivo em meio YPD, foi possível reduzir a fase lag de 6 h para menos de 2 h. Assim, quando todo o substrato foi consumido (antes de 5 h de cultivo) foi iniciada a alimentação de uma solução de glicose concentrada, por pulsos a cada 1,5 h (sempre que a concentração de glicose se aproximava de zero). Assim, foi possível obter uma maior concentração celular, atingindo em 24 h uma concentração de 20,6 g/L.

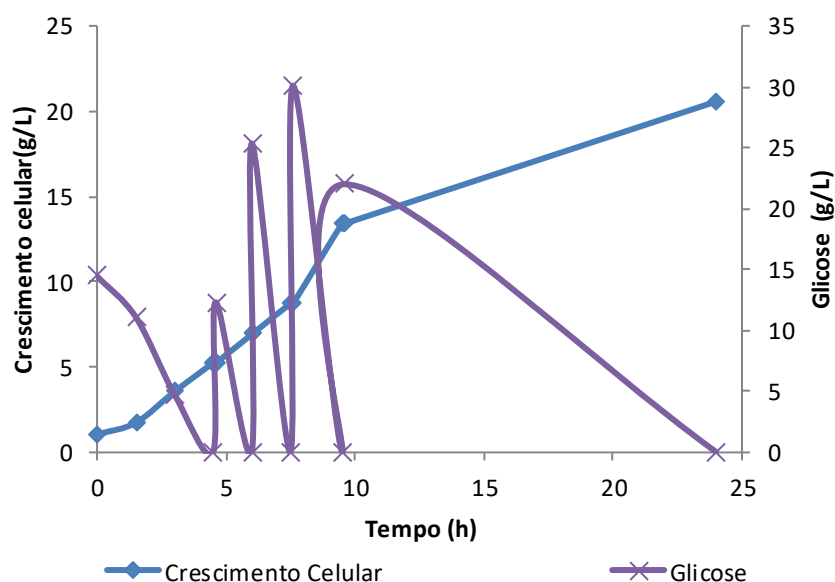


Figura 11 - Avaliação do crescimento celular em 200 mL de meio de cultivo YPD em frascos de Erlenmeyers de 500 mL em incubador rotatório a 30°C e 200 rpm, com alimentação de solução de glicose.

Ao inocular as células utilizando um pré-inóculo de 12 horas e em seguida fazer uma batelada alimentada foi possível atingir uma maior concentração celular, viabilizando uma maior concentração do biocatalisador.

V.2 – Biotransformação de benzaldeído em L-PAC por *S. cerevisiae*

É de conhecimento que benzaldeído apresenta elevada toxicidade para a célula (ROGERS, SHIN e WANG, 1997; ZHANG et al., 2008) e muitos autores sugerem a adição desse substrato quando as células já estão com o metabolismo mais ativo, pois favorece a formação do produto. O tempo de adição de benzaldeído é um parâmetro

de extrema importância para a produção de L-PAC. A adição de benzaldeído logo no início do cultivo influencia o crescimento celular, provavelmente pela inibição de uma ou mais enzimas do metabolismo (MIGUEZ, 2015).

Utilizando o meio otimizado por MIGUEZ et al. (2012), em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL com 50 mL do meio, concentração inicial de *S. cerevisiae* de 30 g/L e adição de benzaldeído após 1 h de fermentação, foram avaliadas duas concentrações de benzaldeído (10,0 g/L e 20,0 g/L) com e sem adição de β -ciclodextrina 2%, como mostram as Figuras 12 e 13.

Com a adição de 10 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina, foi observada a concentração máxima de L-PAC de 6,27 g/L, em 3 horas de experimento (Figura 12). Já em meio de produção de L-PAC sem a adição de β -ciclodextrina, mas com a mesma concentração de benzaldeído, a concentração máxima produzida de L-PAC foi de 0,88 g/L, concentração encontrada em 7 horas de cultivo (Figura 11), um aumento de mais de 7 vezes na produção e mais de 16 vezes na produtividade de L-PAC. Percebe-se na Figura 11 que a glicose não foi totalmente consumida nas 7 horas de cultivo em meio sem β -ciclodextrina, o que sugere um efeito tóxico para as células.

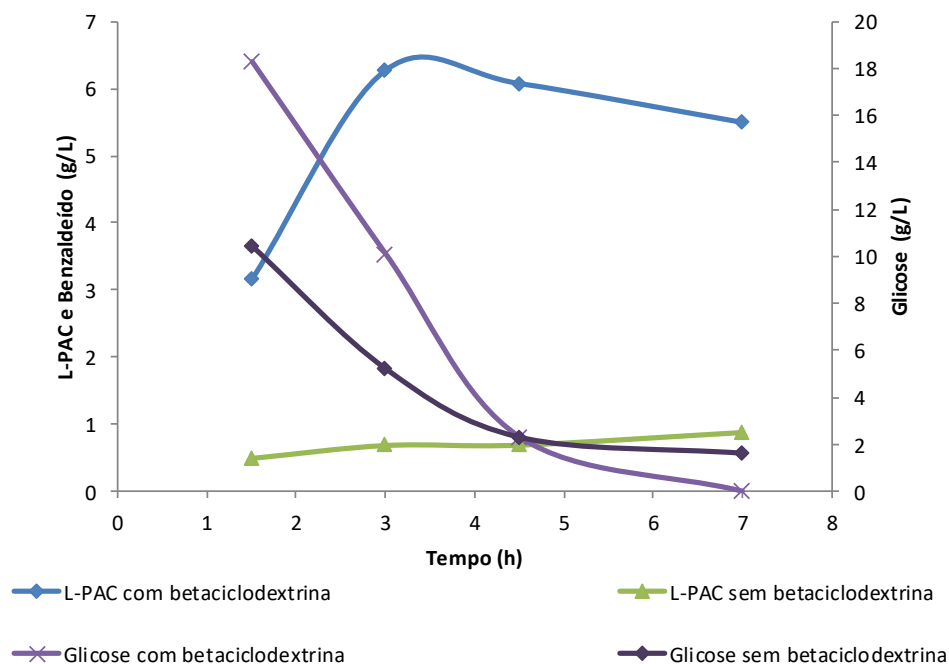


Figura 12 - Produção de L- PAC em frascos agitados com adição de 10 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina e o meio controle (sem adição de β -ciclodextrina).

Com a adição de 20 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina, foi observada a concentração máxima de L-PAC de 7,89 g/L, em 4,5 horas de experimento (Figura 13), um aumento de 25,8% na produção de L-PAC em relação ao cultivo com 10 g/L de benzaldeído, porém redução de 16,3% na produtividade. Em meio de produção sem a adição de β -ciclodextrina a concentração máxima produzida de L-PAC foi de 2,23 g/L, concentração encontrada em 3 horas de cultivo.

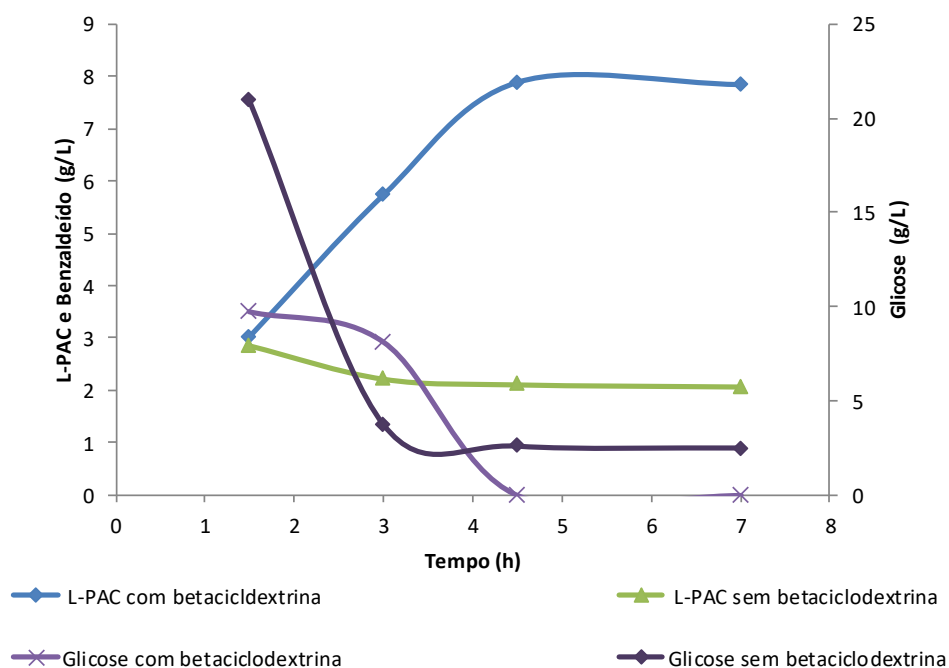


Figura 13 - Produção de L- PAC em frascos agitados com adição de 20 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina e o meio controle (sem adição de β -ciclodextrina).

A maior concentração de L-PAC, 7,89 g/L, foi obtida na concentração de benzaldeído de 20 g/L, porém o melhor rendimento de L-PAC a partir de benzaldeído, $Y_{P/S}$ obtido foi na concentração de 10 g/L de benzaldeído (Tabela 2), produzindo 6,27 g/L de L-PAC em 3 h.

Pode-se observar que a glicose foi consumida mais rapidamente no experimento com 20 g/L de benzaldeído (q_s , Tabela 3). Após 4,5 h de cultivo a concentração de glicose se esgotou e não foi mais observado aumento na concentração de L-PAC.

Tabela 3 - Resultados do estudo realizado com as concentrações de 10 g/L e 20 g/L de benzaldeído com e sem adição de 2% β -ciclodextrina em meio de produção contendo 40 g/L de glicose e concentração inicial de 30 g/L de *S. cerevisiae*.

Condições		Resultados				
Benzaldeído (g/L)	BCD (%)	Conc. máx. de L-PAC (g/L)	Tempo Conc. máx. de L-PAC (h)	Produtividade (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g L-PAC/g benz.)	Taxa de consumo de glicose (g/L.h)
10	0	0,88	7,0	0,13	0,09	5,48
10	2	6,27	3,0	2,09	0,63	5,71
20	0	2,87	1,5	1,91	0,14	5,36
20	2	7,89	4,5	1,75	0,39	8,89

$Y_{P/S}$ = Fator de conversão (g L-PAC/ g de benzaldeído)

É possível perceber que a glicose esgotou nos experimentos em que o meio possuía β -ciclodextrina, zerando a concentração na análise feita com a alíquota retirada no tempo de 4,5 h para a concentração de 20 g/L de benzaldeído e no tempo de 7 h para a concentração de 10 g/L. Pode-se considerar que a adição de glicose durante a produção ou um meio com maior concentração inicial do substrato poderia aumentar o rendimento de L-PAC no cultivo com 20 g/L de benzaldeído.

Na Figura 14 pode-se evidenciar o efeito protetor da β -ciclodextrina em concentrações maiores de 8 g/L de benzaldeído e pode-se observar que o efeito protetor é mantido em concentrações até 20 g/L.

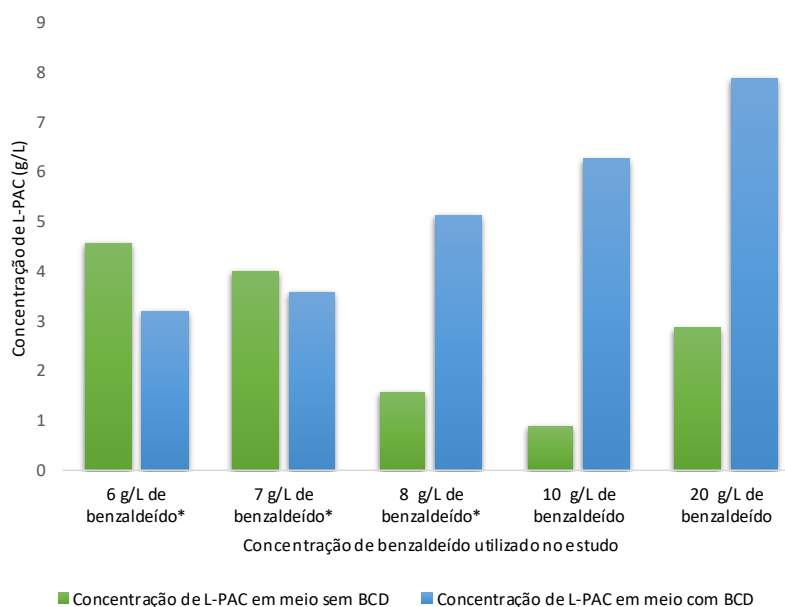


Figura 14 - Efeito protetor da β -ciclodextrina frente a diferentes concentrações de benzaldeído. Resultados de 6 g/L, 7 g/L e 8 g/L reportados por MIGUEZ,2015.

A conversão do benzaldeído em subprodutos foi baixa no experimento com 20 g/L de benzaldeído, com percentual de aproximadamente 10% para o álcool benzílico e nenhuma formação de ácido benzóico (Figura 15).

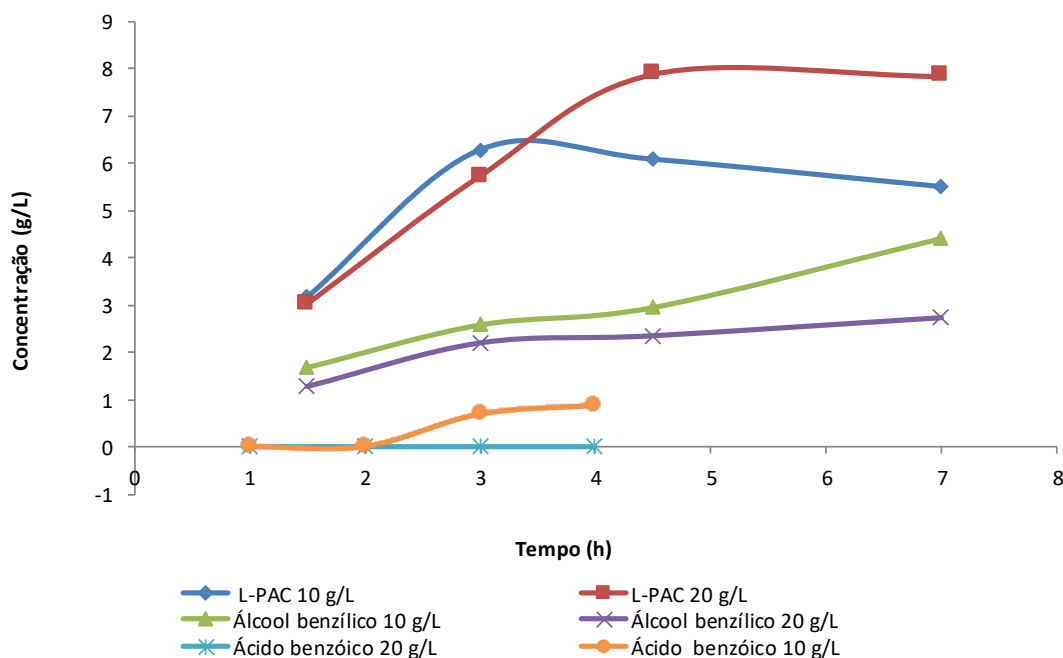


Figura 15 - Formação de subprodutos em meio com adição de 10 g/L e 20 g/L de benzaldeído em meio de produção com 2% de β -ciclodextrina.

Já no experimento com 10 g/L de benzaldeído o percentual de formação de subproduto, principalmente álcool benzílico foi de aproximadamente 45% e 1% para o ácido benzóico.

Portanto, esse resultado reforça a necessidade de se estudar a produção de L-PAC com 20 g/L de benzaldeído com β -ciclodextrina em meio contendo concentrações mais elevadas de glicose, já que nessa condição há menos subprodutos formados.

Capítulo VI – Conclusões

Com o estudo da cinética de crescimento celular foi possível, em batelada alimentada, aumentar a concentração celular atingindo-se uma concentração de 20,6 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*.

Foi possível observar o efeito protetor da β -ciclodextrina frente a altas concentrações de benzaldeído, sendo possível a utilização de 20 g/L de benzaldeído no meio de produção. Aumentou-se a produção em mais de 7 vezes e produtividade de L-PAC em mais de 16 vezes com 10 g/L de benzaldeído quando se adicionou β -ciclodextrina a 2% no meio de produção.

Referências Bibliográficas

ABOURASHED, E. A. et al., Ephedra in perspective a current review, *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 703-712, agosto 2003.

AGARWAL, P.K. et al., Engineering of yeast pyruvate decarboxylase for enhanced selectivity towards carboligation. *Bioresource Technology*, v. 192, p. 90-96, setembro 2015.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Controle e Fiscalização de Efedrina e Pseudoefedrina em Especialidades Farmacêuticas, Disponível em: <http://www.anmat.gov.br/webanmat/mercosur/agregados/Agreg IX Nota Brasil Efedrina Pseudoefedrina.pdf>. Acesso em: 30/01/2021

BRUDER, S. e BOLES E., Improvement of the yeast based (*R*)-phenylacetylcarbinol production process via reduction of by-product formation, *Biochemical engineering journal*, v. 120, p.103-112, abril 2017.

BRUSSE, J., ROOS, E.S. e VAN DER GEN, A., Bioorganic synthesis of optically active cyanohydrins and acyloins, *Tetrahedron Letters*, v. 29, p.4485-4488, julho 1988.

CABRAL, C., PITA, J. R. Ciclo de Exposições: Temas de Saúde, Farmácia e Sociedade. Catálogo, 1. Alcalóides – Relevância na Farmácia e no Medicamento, Centro de Estudos Interdisciplinares do Século XX (CEIS 20) – Grupo de História e Sociologia da Ciência e da Tecnologia, Coimbra, 2015.

CHOW, Y. S., SHIN, H. S. e ADESINA, A. A., A kinetic model for the deactivation of pyruvate decarboxylase (PDC) by benzaldehyde. *Biotechnology Letters*, v.17, p. 1201-1206, novembro 1995.

CHUNG, W.S., et al., Modification of face selectivity by inclusion in cyclodextrins, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 112, p. 1202-1205, janeiro 1990.

COUGHLIN, R.W., MAHMOUD, W.M. e EL-SAYED, A.H., Enhanced bioconversion of toxic substances. US Patent 5173-413. 28.02.91-US Patent 663828 (22.12.92.) 28.02.91 as 663328 93-017565/02, 1991.

DOOSTMOHAMMADI, M et al., Biotransformation of benzaldehyde to L-phenylacetyl carbinol using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Minerva Biotechnol*, v. 27, p. 43-49, março 2015.

ELLIAH, P. e KRISHNA, K.T., Studies on the production of phenyl acetyl carbinol from benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*, *Indian Drugs*, v. 24, p. 192-195, 1987.

IRANMANESH, E., MOHAMMAD, A. A.e BIRIA, D., Improving L-phenylacetylcarbinol production in *Saccharomyces cerevisiae* by in silico aided metabolic engineering, *Journal of biotechnology*, v. 308, P. 27-34, janeiro 2020.

FETROW, C. W. e AVILA, J. R., *Professional's handbook of complementary and alternative medicines*, 2nd ed, Springhouse corporation, 2001.

GUNAWAN, C., et al., Improved (R)-phenylacetylcarbinol production with *Candida utilis* pyruvate decarboxylase at decreased organic to aqueous phase volume ratios, *Biotechnol. Lett.*, v.30, p. 281-286, 2008.

KHAN, T. R. e DAUGULIS, A. J., Application of Solid–Liquid TPPBs to the Production of L-Phenylacetylcarbinol from Benzaldehyde Using *Candida utilis*, *Biotechnology and Bioengineering*, v.107(4), p. 633-64, novembro 2010.

KHAN, M. A.; JAVED, M. M. e QADEER, M. A. Studies on the production of L-phenylacetylcarbinol by *Candida utilis* in shake flask. *Pak. J. Bot.*, v. 44, p. 361-364, 2012.

KUMAR, M. R. CHARI, M. A., NARASU, M. L., Production of L-phenyl Acetyl Carbinol (L-PAC) by different novel strains of yeasts in molasses and sugar cane juice as production medium. *Research Journal of Microbiology*, v.5(11), p. 1155-1159, 2010.

LONG, A. e WARD, O.P., Biotransformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of fermentation and toxicity of substrate and products. *Biotechnology and Bioengineering*, v.34, p. 933-941, outubro 1989.

MAHMOUD, W.M., EL-SAYED, A.H.M.M. e COUGHLIN R.W., Effect of β -Cyclodextrin on Production of L-Phenylacetyl Carbinol by Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioengineering*, v.36(3), p. 256-262, julho 1990.

MIGUEZ, M. *et al.*, Selection of yeasts for the production of L-phenyl-acetylcarbinol by biotransformation in shake flasks, *Chemical Engineering Transactions*, v. 27, p. 163-168, junho 2012.

MIGUEZ, M. Síntese de L-fenil-acetil-carbonil (L-PAC) por processo fermentativo. Rio de Janeiro, 2015. 123 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2015.

MURRAY, M., *The Healing Power of Herbs: The Enlightened Person's Guide to the Wonders of Medicinal Plants*, 2 edição, Three Rivers Press, 1995.

NEUBERG, C. e LIBERMANN, L., Zur kenntnis der carboligase: II. *Mitteilung*. *Biochemische Zeitschrift*, v. 121, p. 311-325, 1921.

NIKOLOVA, P. e WARD, O. P., Production of L-phenylacetyl carbinol by biotransformation: product and by-product formation and activities of the key enzymes in wild-type and ADH isoenzyme mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 38, p. 493-498, agosto 1991.

OLIVEIRA, A. A. C., SOUSA, T. V. S., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A. Z. EARAUJO, O.Q.F. Study of morphological and physiological parameters of cultures of *Yarrowia lipolytica* undergone electrochemical stress. *Chemical Engineering Transactions*, v.20, p.133-138, 2010.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D. e COELHO, P., Ciclodextrinas: Formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480.6 70-83, 2009.

OLIVER, A. L.; RODDICK, F. A. e ANDRESON, B. N., Cleaner production of phenylacetylcarbinol by yeast through productivity improvement and waste minimization. *Pure Appl. Chem.* v. 69, p. 2371-2385, novembro 1997.

RAABO, E. e TERKILDSEN, T.C., On the enzymatic determination of blood glucose. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 12, p. 402-407, 1960.

ROGERS, P. L., SHIN, H. S., & WANG, B., Biotransformation for L-Ephedrine Production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 56, p. 33-59, 1997.

SEHL, T. *et al.*, Asymmetric synthesis of (S)-phenylacetylcarbinol-closing a gap in C-C bond formation, *Green Chem.*, v. 19(2), p. 380-384, 2017.

ROSCHE, B. *et al.*, Biotransformation of benzaldehyde into (R)-phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 309–315, agosto 2001.

ROSCHE, B. *et al.*, Screening of yeasts for cell-free production of (R)-phenylacetylcarbinol, *Biotechnol, Biotechnology Letters*, v. 25(11), p. 841-845, abril 2003.

SHIN, H. S. e ROGERS, P. L., Biotransformation of benzaldehyde to L -phenylacetylcarbinol, an intermediate in L -ephedrine production, by immobilized *Candida utilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 44(1), p. 7-14, março 1995.

SHIN, H. S. e ROGERS, P. L., Production of L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) from Benzaldehyde Using Partially Purified Pyruvate Decarboxylase (PDC). *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49(1), p. 52-62, 1996.

SHUKLA, V.B. e KULKARNI, P.R. . L -Phenylacetylcarbinol (L -PAC): biosynthesis and industrial applications. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 16(6), p. 499-506, junho 2000.

SHUKLA, V.B. e KULKARNI, P.R., Process parameters and reusability of the free cell mass of *Torulaspora delbrueckii* for the production of L-phenyl acetyl carbinol (L-PAC). *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 17(3), p. 301-306, março 2001.

SHUKLA, V. B. *et al.*, Biotransformation of benzaldehyde to L-phenylacetylcarbinol (L-PAC) by *Torulaspora delbrueckii* and conversion to ephedrine by microwave radiation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.77(2), p. 137-140, fevereiro 2002.

SILVA, S. F., MENEZES, P. M. N., DE SÁ, S.M., Coleção Manuais da Farmácia, Editora Sanar, 2020.

SONI, M. G. *et al.*, Safety of ephedra: lessons learned. *Toxicol Lett* 150: 97- 111, 2004.

SZEJTLI, J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chemical Reviews*, v. 98(5), p. 1743-1753, julho/agosto 1998.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F. e IRIE, T., Cyclodextrin drug carrier systems, *Chemical Reviews*, v. 98(5), p. 2045-2076, julho 1998.

VEIGA, F., PECORELLI C. e RIBEIRO L., As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica, *Edições Minerva* Coimbra, 2006

VITOLO, M. DURANTI, M.A., PELLERGRIM, M. B. Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact *S. cerevisiae* cells grows in sugar cane blackskrop molanes. *J. Ind. Microbiol*, Amsterdam, v. 15, 1995.

VOJTISEK, V. e NETRVAL, J., Effect of pyruvate decarboxylase activity and pyruvate concentration on the production of 1-hydroxy-1-phenylpropanone in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Folia Microbiologica*, v. 27, p. 173-177, 1982.

World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific. Guidelines for Evaluating the Safety and Efficiency of Herbal Medicines. Manila, 1999.

ZHANG W. et al., Production of L-phenylacetylcarbinol by microbial transformation in polyethylene glycol-induced cloud point system. *Apply Microbiol Biotechnol*, v. 78, p. 233–239, fevereiro 2008.